

10/526028

PCT/CN02/00660

证 明

REC'D 07 NOV 2002

WIPO PCT

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2002 08 28

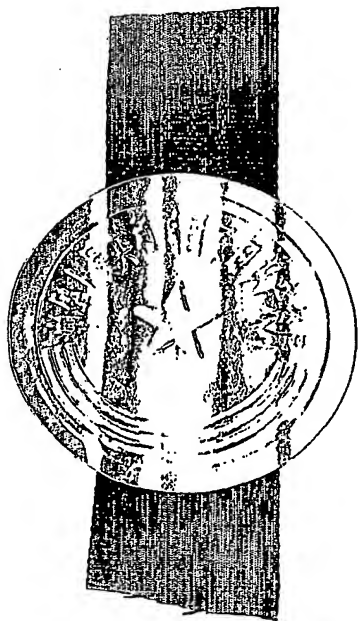
申 请 号： 02 1 36688.8

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子在造血方面的协同作用

申 请 人： 上海益众生物技术有限公司

发明人或设计人： 刘智慧； 陈统一； 崔大敷； 施德源； 费俭； 陈中伟； 李默漪； 邵云潮； 石嘉豪； 费琴明； 陆怡； 陈红红； 程文英； 罗伟华



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2002 年 10 月 15 日

权 利 要 求 书

1. 一种药物组合物, 其特征在于, 含有安全有效量的成骨生长肽、安全有效量的粒细胞集落刺激因子以及药学上可接受的载体, 其中成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的摩尔比为 0.25: 1 至 100: 1。

2. 如权利要求 1 所述的药物组合物, 其特征在于, 还含有选自下组的组分: GM-CSF、EPO、白介素 2、或其混合物。

3. 如权利要求 1 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述的成骨生长肽选自下组: 人 OGP、OGP 相关肽、及其医药上可接受的盐, 以及它们的混合物。

4. 如权利要求 1 所述的药物组合物, 其特征在于, 成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的摩尔比为 1: 1 到 20:1。

5. 如权利要求 1 所述的药物组合物, 其特征在于, 成骨生长肽的安全有效量为 0.1 μ g-100mg/kg 体重, 粒细胞集落刺激因子的安全有效量为 0.1-1000 μ g/kg 体重。

6. 如权利要求 1 所述的药物组合物, 其特征在于, 药物组合物的剂型是针剂、或冻干粉剂。

7. 如权利要求 2 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述的人 OGP 具有以下氨基酸序列: ALKRQGRTLYGFGG;

所述的 OGP 相关肽是来源于 OGP 的 C 末端, 具有式(I)氨基酸序列的肽:

X1-X2-Y-X3-F-X4-X5-X6- X7 (I)

其中 X1 为氨基、乙酰基、乙酰化氨基酸或去氨基的氨基酸; X2、X6 可以不存在或是单个氨基酸, 也可以是多个氨基酸或肽; X3、X4、X5 是单个氨基酸; X7 为氨基、羧基或羟基, 其中 X1 至 X6 中所述的氨基酸选自: Gly, Ala, Asp, Glu, Asn, Gln, Ser, Thr, Leu, Ile, Lys, Arg, Phe, Tyr, Trp, Pro,

Cys, Met, His, Val;

Y 为酪氨酸, F 为苯丙氨酸, 且 OGP 相关肽的长度为 5-15 个氨基酸。

8. 一种制备药物的方法, 其特征在于, 包括步骤:

将成骨生长肽、粒细胞集落刺激因子以及药学上可接受的载体混合在一起, 制得药物, 其中成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的摩尔比为 0.25: 1

至 100: 1。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的摩尔比为 1: 1 到 20:1。

10. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，药物的剂型是针剂、或冻干粉剂。

成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子在造血方面的协同作用

5 技术领域

本发明涉及医学领域，更具体地涉及成骨生长肽(Osteogenic growth peptide, OGP)与粒细胞集落刺激因子(G-CSF)在造血方面的协同作用，以及含有 OGP 和 G-CSF 的药物组合物。

10 背景技术

Itai Bab 等人于 1988 年在人和动物体内发现成骨生长肽(Osteogenic growth peptide, OGP)，一种能促进骨细胞生长的 14 个氨基酸组成的多肽。OGP 是来源于组蛋白 H4 C 末端的 14 肽，即组蛋白 H4 的基因转录后，在 mRNA 水平经由 AUG85 起始翻译，加工后的产物[Bab I, et al. (1999) J Biol Chem 274(20): 14474-14481]。当骨髓再生时，能释放几种促进成骨的因子进入血液循环而致全身成骨反应增强，经分离纯化得到成骨生长肽 [Bab I, et al. (1988) Endocrinology 123: 345-352; Bab I, et al. (1992) EMBO J. 11: 1867-1873]。

存在于人和鼠血清中的 OGP，它们的 OGP 序列完全一致，具有相同的生物活性 [Greenberg Z, et al. (1995) J Clin Endocrinol Metab 8: 2330-2335]。生理状态下，OGP 主要以结合的形式，即 OGP-OGP 结合蛋白(OGPBP)复合物的形式存在，约占 OGP 总量的 80%-97%[Greenberg Z, et al. (1995) JCE & M. 80(8): 2330-2335]。血清中 OGP 结合蛋白为 α 2 巨球蛋白，其作用可能是保护血清中的 OGP 以免降解，或调解 OGP 活性部分在血清中的水平 [Gavish H, et al. (1997) Biochemistry 36: 14883-14888]。OGP 的 C 端 5 肽，可能是在 OGP 与其结合蛋白的解离过程中的酶解产物，同样天然存在并具有与 OGP 许多相似活性[Bab I, et al. (1999) J Pept Res 54: 408-414]

合成的成骨生长肽(sOGP)，与天然分子序列完全一致，体外具有促成骨细胞、成纤维细胞和人骨髓基质细胞增殖，促进成骨细胞、人及兔的骨髓基质

细胞碱性磷酸酶活性；体内促进大鼠骨形成和骨小梁质量 [Bab I., et al. (1992) EMBO J. 11: 1867-1873; Robinson D. et al. (1995) J. Bone and Mineral Research 10(5): 690-696]。

OGP 不但具有成骨作用，而且有助于造血。OGP 可以促进外周血白细胞和骨髓细胞数的增加，放射损伤的小鼠在骨髓移植前开始给予 sOGP，可以帮助造血重建并增加小鼠的存活率 [Gurevitch O, et al. (1996) Blood 88(12): 4719-4724]。环磷酰胺造成的小鼠骨髓损伤给予 OGP 的 C 端 5 肽，可以加快小鼠外周血白细胞的恢复，并可以动员小鼠外周血干细胞 [Rita F, et al. (2002) Leukemia Research 19-27]。但是，OGP 在造血方面的作用效果较弱，明显弱于粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)，粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。

G-CSF 已经用于临床，目前已有几种商品出售。如非格司亭 (filgrastim)，为来源于大肠杆菌的非糖基化的重组蛋白；来格司亭 (lenograstim)，来源于中国地鼠卵巢细胞的糖基化分子。还有托司亭 (nartograstim)，是 N 端被取代了的分子 [Maruyama K, et al. (1998) Bone Marrow Transplant 22(4): 313-320]。G-CSF 的主要生物作用是促使粒系祖细胞增殖及分化为中性粒细胞，以及促进成熟中性粒细胞的存活和功能完善，包括吞噬功能、杀菌功能以及依赖抗体细胞介导的细胞毒性作用等 [Ohsaka A, et al. (1998) Br J Haematol 100(1): 66-69]。近年来研究发现，对于难治性急性粒细胞白血病，慢性粒细胞白血病，在造血祖细胞危象期使用联合预处理方案 (包括全身照射、大剂量阿糖胞苷、G-CSF) 后进行异体骨髓移植，能降低复发率及改善无病存活率，而不引起严重的不良反应 [Takahashi M, et al. (1997) Am J Hematol 56(1): 42-44; Takahashi S, et al. (1998) Am J Hematol 57(4): 303-308]。目前，G-CSF 还被用于动员外周血干细胞，用于自体或异体移植，最常用的动员方案为使用环磷酰胺后再用 G-CSF 或单用 G-CSF，但这两种方案所动员的造血干/祖细胞 (CD34⁺细胞) 具有不同的克隆源潜能，故不同目的应采用不同的动员方案 [Cesana C, et al. (1998) Bone Marrow Transplant 21(6): 561-568]。

目前，已发现许多生长因子可以促进高剂量化疗组或正常组小鼠外周血干细胞的动员，用于外周血干细胞移植，或提高放化疗后骨髓有核细胞数量，恢复外周血白细胞数。其中有粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)，粒细胞-巨噬细胞

集落刺激因子(GM-CSF), 白介素 3(IL-3), 干细胞因子(SCF), FLT-3 配体等等
[Bungart B, et al. (1990) Br J Haematol 76(2): 174-179; Lane T, et al.
(1995) Blood 85(1): 275-282; Brugger W, et al. (1992) Blood 79(5):
1193-1200; Molineux G, et al. (1991) Blood 78(4): 961-966; Ashihara E,
5 et al. (1998) Eur J Haematol 60(2): 86-92]。临床上主要应用重组人粒系
集落刺激因子(rh G-CSF)和/或重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rh GM-
CSF)动员外周血干细胞用于外周血干细胞移植或促进放化疗后造血功能恢复。
但两者价格昂贵, 工薪阶层不胜负担。此外, 临床使用上还存在一些问题: 高
剂量 rh G-CSF 会导致骨痛等副反应, 高剂量 rh GM-CSF 会伴随着发热。并且
10 用它们动员外周血干细胞用于外周血干细胞移植时, 很难在一个给药疗程得到
足量的外周血干细胞用于移植, 给干细胞提供者带来痛苦, 而接受者需要等待
下一次干细胞移植, 增加了危险性。IL-8, IL-11, SCF, FLT-3 配体或巨噬细
胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α)也可以动员外周血干细胞, 但效果弱于 G-CSF 或 GM-
CSF[Andrews RG, et al. (1992) Blood 80: 920-927; Haas R, et al. (1993)
15 12: 643-649; Lemoli RM, et al. (1993) 21: 1668-1672; Jacoben SE, et al.
(1995) J Exp Med 181: 1357-1363; Laterveer L, et al. (1996) 87: 781-788;
Hunter MG, et al. (1995) 86: 4400-4408]。

因此, 本领域迫切需要价格低廉的、用于促进造血的药物组合物。

20 发明内容

本发明的目的就是提供一种价格低廉的、用于促进造血的药物组合物。
本发明的另一目的是提供所述药物组合物的制备方法。

在本发明的第一方面, 提供了一种药物组合物, 含有安全有效量的成骨
25 生长肽、安全有效量的粒细胞集落刺激因子以及药学上可接受的载体, 其中成
骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的摩尔比为 0.25: 1 至 100: 1。

在一有效量中, 所述的药物组合物还含有选自下组的组分: GM-CSF、EPO、
白介素 2、或其混合物。

在另一优选例中, 所述的成骨生长肽选自下组: 人 OGP、OGP 相关肽、及

其医药上可接受的盐，以及它们的混合物。

在另一优选例中，成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的摩尔比为 1: 1 到 20:1。

在另一优选例中，所述的药物组合物，药物组合物的剂型是针剂、或冻干粉剂。

在本发明的第二方面，提供了一种制备药物的方法，包括步骤：

将成骨生长肽、粒细胞集落刺激因子以及药学上可接受的载体混合在一起，制得药物，其中成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的摩尔比为 0.25: 1 至 100: 1。

10 在本发明的第三方面，通过了 OGP 和/或 OGP 相关肽联合 rhG-CSF 的用途，它们被用于制备增强 rhG-CSF 在造血方面功能的药物组合物。

附图说明

15 图 1 显示了给予 sOGP 5 天后，再联合 rh G-CSF 对正常小鼠给药，对不同时间白细胞 (WBC) 数的影响。

#：联合给药组与单独使用 rh G-CSF 组比较， $p < 0.0005$

*：联合给药组与单独使用 rh G-CSF 组比较， $p < 0.05$

图 2 显示了给予 sOGP 5 天后，再联合 rh G-CSF 对正常小鼠给药，对不同时间淋巴细胞 (LY) 数的影响。

20 #：联合给药组与单独使用 rh G-CSF 组比较， $p < 0.0005$

*：联合给药组与单独使用 rh G-CSF 组比较， $p < 0.05$

图 3 显示了给予 sOGP 5 天后，再联合 rh G-CSF 对正常小鼠给药，各实验组的胸骨切片的病理观察，图 3A 为正常对照组；3B 为单独给予 sOGP 组；3C 为 sOGP 联合 rh G-CSF 组；3D 为单独使用 rh G-CSF 组。

25 图 4 显示了给予 sOGP 5 天后，再联合 rh G-CSF 对正常小鼠给药，各实验组的脾脏切片的病理观察，图 4A 为正常对照组；4B 为单独给予 sOGP 组；4C 为 sOGP 联合 rh G-CSF 组；4D 为单独使用 rh G-CSF 组。

图 5 显示了同时给予 sOGP、rh G-CSF 对正常小鼠给药前后不同时间白细胞 (WBC) 数的影响。

#： 联合给药组与单独使用 rh G-CSF 组比较， $p < 0.00005$ 。

具体实施方式

5 本发明人经过广泛而深入的研究，发现成骨生长肽(OGP)联用 G-CSF 具有协同作用，可以明显加强 G-CSF 的功效，从而更有效地促进粒系为主的造血细胞增殖，动员外周血干细胞。在此基础上完成了本发明。

10 如本文所述，术语“促进造血”是指 OGP 联合 G-CSF 对正常人外周血干细胞的动员作用，对病理状况或放射损伤或使用化疗药物时产生的外周血中性粒细胞的减少的恢复作用。

在本文中，术语“氨基酸”除非特指，均指以下 20 种天然氨基酸(以三字母符表示)：Gly, Ala, Asp, Glu, Asn, Gln, Ser, Thr, Leu, Ile, Lys, Arg, Phe, Tyr, Trp, Pro, Cys, Met, His, Val。该术语包括 D 型和 L 型氨基酸。此外，该术语还包括非天然氨基酸、甲基化氨基酸、allo 氨基酸。

15

粒细胞集落刺激因子(G-CSF)

可用于本发明的 G-CSF 可以是任何来源的天然的，重组的 G-CSF，其类似物和活性片段，以及医药上可接受的盐。特别优选的是重组的人 G-CSF。G-CSF 的商品化产品包括(但不限于)：非格司亭(filgrastim)、来格司亭

20 (lenograstim)，托司亭(nartograstim)、或其混合物。

粒细胞集落刺激因子的安全有效量通常为 0.1-1000ug/kg 体重，较佳地为 0.2-250ug/千克体重。例如，用于人体，rhG-CSF 在不同的适应症，如放化疗前后，动员外周血，骨髓移植时等，剂量范围 0.4-100ug/kg 体重。用于大鼠等哺乳动物时，剂量可用到 100-500 ug/kg 体重。

25

成骨生长肽

如本文所用，术语“成骨生长肽”包括 OGP 的天然多肽，人工合成多肽，所有类似物，OGP 相关肽，以及医药上可接受的盐。

可用于本发明的成骨生长肽包括上述各种形式的 OGP，尤其是人工合成的

或重组表达的 OGP。

一种优选的 OGP 是天然序列的 OGP，其氨基酸序列如下：

ALKRQGRTLYGFGG；

此外，OGP 相关肽也可用于本发明，优选的 OGP 相关肽是来源于 OGP 的 C
5 末端，具有式(I)氨基酸序列的肽：

X1-X2-Y-X3-F-X4-X5-X6-X7 (I)

其中 X1 为氨基、乙酰基、乙酰化氨基酸或去氨基的氨基酸；X2、X6 可以
不存在或是单个氨基酸，也可以是多个氨基酸或肽；X3、X4、X5 是单个氨
基酸；X7 为氨基、羧基或羟基，其中 X1 至 X6 中所述的氨基酸选自：Gly, Ala,
10 Asp, Glu, Asn, Gln, Ser, Thr, Leu, Ile, Lys, Arg, Phe, Tyr, Trp, Pro,
Cys, Met, His, Val；

Y 为酪氨酸，F 为苯丙氨酸，且 OGP 相关肽的长度为 5-15 个氨基酸。

以前的研究已经表明，只要保留 Y 和 F 两个活性位点，式(I)结构的 OGP
相关肽就具有 OGP 活性(参见美国专利 5,814,610 和 Chen YC 等人, J Med
15 Chem 2002 Apr 11;45(8):1624-32)。

至于获得 OGP 及其相关肽的方法，没有任何特别限制。它们可以是固相
或液相化学合成技术、或是基因工程方法、或用酶切加工方法制得的。

一种优选的方法是使用常规肽化学合成技术，以固相法或液相法合成本
发明的 OGP 及其相关肽，但较好是使用固相合成方法(例如参见
20 Birr, C., Aspect of the Merrifield Peptide Synthesis, Springer-Verlag,
Heidelberg, 1978; Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd.
ed., Pierce Chem. co., Rockford, IL, 1984; Barany, G. And Merrifield
R. B. in The Peptides, Vol. 2; Gross, E. & Meienhoffer J., eds., Academic
Press, New York, pp3-284, 1979)。简单地说，首先按照已设计好的和给定的
25 氨基酸序列，利用适当的活化剂和缩合剂将经适当保护基团保护的肽链 C 末端
氨基酸残基连接到固相载体上。根据连接的氨基酸的不同，可选择使用各种不
同的用于肽合成的固相载体，例如包括但不只限于聚乙醇、二乙烯苯交联的聚
苯乙烯、聚丙烯酰胺树脂。

并可用已知方法将用上述技术或以重组 DNA 技术制得的 OGP 制成其医药

上可接受的盐。例如，可按本领域技术人员熟知的方法，用适当的酸、碱处理这些肽得到合适的盐。

在本发明中，成骨生长肽的安全有效量通常为 0.1 μ g-100mg/kg 体重，较佳地为 0.5 μ g-10mg/千克体重。

5

药物组合物

本发明的药物组合物中，含有以下组分：

- (1) OGP 和/或 OGP 相关肽，或其医药上可接受的盐，
- (2) 可接受药物量的 G-CSF 或其医药上可接受的盐，
- 10 (3) 药学上可接受的载体，

其中成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的摩尔比为 0.25: 1 至 100: 1。较佳地，摩尔比为 1: 1 至 20: 1。

一种优选的确定的方法是，先将 G-CSF 的用量选定为常规的可接受量的 G-CSF，然后根据上述摩尔比确定 OGP 的用量。由于 OGP 为短肽，成本较低，
15 因此其用量通常大于或等于 G-CSF 的用量，以获得最佳的效益/成本比。

除了含有 OGP 和/或 OGP 相关肽(及 rhG-CSF)外，本发明的药物组合物还可以含有任何临床上使用的应用于造血方面的药物，GM-CSF、EPO、或其医药上可接受的盐，或其混合物。此外，还可以含有任何临床上使用的应用于提高免疫方面的药物，如白介素 2 (IL-2) 或其混合物，及其医药上可接受的盐。

20 除了含有上述组分之外，本发明的药物组合物还包含常规的溶剂和防腐剂。对于溶液形式的药物组合物，其 pH 范围没有特别限制，通常为从 4 到 8.5。此外，药物组合物还可制成冻干制剂。

本发明中药物组合物可含适当的载体或稀释剂，如水、生理盐水、等渗葡萄糖溶液以制成可经肠胃道以外途径给药的溶液剂、针剂、乳剂、滴鼻剂、
25 滴眼剂。也可加入淀粉、乳糖、滑石粉、蔗糖、葡萄糖或甘油、液体石蜡、脂质体、白蛋白或明胶等赋形剂或载体，将本发明的 OGP 及 G-CSF 制成可经胃肠道途径给药的栓剂、片剂、粉剂、颗粒剂、胶囊剂或脂质体包裹剂。这些制剂中除含有活性成分和适当的载体或赋形剂外，还可根据需要添加一些其他辅助成分，例如一种或多种稀释剂、填充剂、乳化剂、防腐剂、表面活性剂、吸收

促进剂、缓冲剂、香味剂及着色剂。

至于本发明药物组合物的施用方法，没有特别限制，可以是与制剂形式相匹配的各种给药方式，例如，皮下、肌内、滴注等。

本发明的药物组合物具有以下用途：

- 5 (1) 促进外周血干细胞移植供者的外周血干细胞动员；
 (2) 治疗病理状况或放射损伤或化疗药物时产生的外周血中性粒细胞的减少；
 (3) 加速骨髓移植时外周血白细胞的恢复，帮助供者细胞的存活；
 (4) 应用于急性放射病的防治；

10

本发明人制备了 OGP 和 G-CSF 的组合物，并通过下列实验观察 OGP 联合 rh G-CSF 对于正常小鼠的促造血作用：

- a) OGP 联合 rh G-CSF 对于正常小鼠外周血白细胞数的影响；
 b) OGP 联合 rh G-CSF 对于正常小鼠外周血淋巴细胞数的影响；
15 c) OGP 联合 rh G-CSF 对于正常小鼠外周血红细胞、血小板数的影响；
 d) OGP 联合 rh G-CSF 对于正常小鼠骨髓有核细胞数及骨髓有核细胞分类的影响。
 e) 对正常小鼠胸骨切片的病理观察；
 f) OGP 联合 rh G-CSF 对于正常小鼠脾脏重量的影响；
20 g) 对正常小鼠脾脏切片的病理观察。

结果表明，成骨生长肽(OGP)联合 G-CSF 可以明显促进正常小鼠外周血白细胞(WBC)的增加，其增加数为单独使用相同剂量 G-CSF 的 2-3 倍，相对于正常对照组增加 5-6 倍。sOGP 联合 rh G-CSF 可以明显促进正常小鼠外周血淋巴细胞(LY)的增加，其增加数为单独使用相同剂量 rh G-CSF 的 2-3 倍，相对于正常对照组增加 3-4 倍。同时，促进小鼠脾脏的增大，脾脏切片中有核细胞分类检测可促使脾脏粒系方向造血。通过骨髓有核细胞记数，骨髓涂片检测，胸骨切片检测，给药组并未发生骨髓的异常增生。

25

至于协同作用的机理，本发明人认为，OGP 可能通过降低造血干/祖细胞表面的黏附分子如整合素等，促使干/祖细胞从骨髓释放到外周血，进行髓外，

如脾脏造血以加强 G-CSF 的功能；也可能通过影响骨髓基质微环境、作用于骨髓基质细胞，增加其它造血因子的表达，或者 G-CSF 受体的上调，从而促进 G-CSF 的作用。然而，应理解，本发明并不受上述机理的限制。

5 本发明的这些研究说明，sOGP 联合 rh G-CSF 这一药物组合物可以有效地促进造血，而未发生骨髓异常增生等副反应。并且该药物组合有可能用于免疫系统的疾病。在临床上有广泛的应用前景。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验
10 方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1

用 Fmoc 系统或 Boc 系统合成 OGP 及其相关肽

按中国专利申请 CN 99113596.2 中所述的方法，用 Fmoc 系统或 Boc 系统
15 合成 OGP 及其相关肽。以 Boc 系统合成 OGP 为例，起始 0.32mmol BocQ-Pam-树脂，按多肽顺序由 C 端逐个向 N 端延伸。各种 Boc 氨基酸所用的保护基分别为 Lys(CI₂), Arg(Tos), Thr (Bzl), Tyr(BrZ)。缩合剂为 DCCI，加 HOBT 以活化各氨基酸的羧基。每轮循环开始，以 50%TFA 去除 Boc，然后以 10% DIEA 中和。肽链合成后，用含 5%对甲苯酚的干燥氟化氢在 0 °C 处理 80 分钟，
20 把肽链从树脂上裂解下来，同时去除各种保护基，用 1N HAc 抽提，Sephadex G10 脱盐后冷冻干燥，获得粗肽，然后用 TSK HW-40F 凝胶柱层析分离纯化。进行氨基酸组成和纯度鉴定。

结果制得了氨基酸序列为 ALKRQGRTLYGF₂GG 的 OGP，以及多种 OGP 相关肽。

25 实施例 2

成骨生长肽和 G-CSF 在促进造血方面的协同作用

2.1 材料

成骨生长肽：实施例 1 中制得的合成 OGP (sOGP)。

粒细胞集落刺激因子：市售的重组人粒系集落刺激因子 (rh G-CSF)。

2.2 方法:

采用清洁级 Balb/c 小鼠, 随机分组, 每组 7-10 只。分两批实验进行。

5 实验 1.

小鼠共分 4 组。研究 sOGP 与 rh G-CSF 协同作用时, 先给予 sOGP 5 天后, 再同时给予 sOGP 和 rh G-CSF。

A 组: 正常对照组;

B 组: 单独给予 sOGP 组, 剂量为 0.5nmol/鼠;

10 C 组: 联合使用 sOGP、rh G-CSF 组, sOGP 剂量为 0.5nmol/鼠, 而 rh G-CSF 剂量为 100ug/kg 体重, 两者摩尔比约为 5.5: 1;

D 组: 单独给予 rh G-CSF 组, 剂量为 100ug/kg 体重。

B 组从第一天开始给予 sOGP, 连续 13 天, 每天给药; C 组在连续给予 sOGP 5 天后, 再同时给予 sOGP 和 rh G-CSF, 持续 8 天; D 组从第 6 天开始给予 rh
15 G-CSF, 持续 8 天。各组小鼠于第 14 天处死。

检测指标如下:

(1) 各组分别于第 1 天(未给药时), 第 5 天, 第 8 天, 第 10 天, 第 12 天, 第 14 天检测外周血白细胞(WBC)数, 外周血淋巴细胞(LY)数, 红细胞(RBCs)数以及血小板(PLT)的变化;

20 (2) 第 14 天检测各组小鼠骨髓有核细胞数(BMNC), 骨髓分类变化;

(3) 第 14 天检测各组小鼠胸骨切片的情况;

(1) 第 14 天检测各组小鼠脾重, 脾脏切片的情况。

实验 2.

25 小鼠共分 4 组。研究 sOGP 与 rh G-CSF 协同作用时, 同时给予 sOGP 和 rh G-CSF。

A 组: 正常对照组;

B 组: 单独给予 sOGP 组, 剂量为 0.5nmol/鼠;

C 组: 联合使用 sOGP、rh G-CSF 组, sOGP 剂量为 0.5nmol/鼠, 而 rh G-CSF

剂量为 100ug/kg 体重，两者摩尔比约为 5.5: 1;

D 组: 单独给予 rh G-CSF 组, 剂量为 100ug/kg 体重。

B 组从第一天开始给予 sOGP, 连续 10 天, 每天给药; C 组同时给予 sOGP 和 rh G-CSF, 持续 10 天; D 组从第一天开始给予 rh G-CSF, 持续 10 天。各

5 组小鼠于第 11 天处死。

检测指标如下:

(1) 各组分别于第 1 天(未给药时), 第 3 天, 第 5 天, 第 7 天, 第 9 天,

第 11 天检测外周血白细胞(WBC)数;

(2) 第 11 天检测各组小鼠骨髓有核细胞数(BMNC);

10 (3) 第 11 天检测各组小鼠脾重。

2.3 统计学处理

各项数据均以 $\bar{x} \pm se$ 表示, 实验数据采用 t 检验。

15 2.4 结果

结果如图 1-5 以及表 1-5 所示, 其中

表 1 显示了给予 sOGP 5 天后, 再联合 rh G-CSF 对正常小鼠给药, 对其外周血粒细胞、淋巴细胞比例的影响, 对红细胞(RBCs)数以及血小板(PLC)数的影响。

表 1

20

	%白细胞		白细胞 ($\times 10^6/ml$)	红细胞 ($\times 10^9/ml$)	血小板 ($\times 10^6/ml$)
	粒细胞	淋巴细胞			
对照	28.26 ± 1.67	71.74 ± 1.67	9.77 ± 0.81	7.40 ± 0.24	502.29 ± 14.66
sOGP	48.90 ± 1.83	51.10 ± 1.83	6.56 ± 0.42	7.02 ± 0.10	500.88 ± 11.20
sOGP+rhG-CSF	63.06 ± 1.20	36.94 ± 1.20	35.1 ± 5.67	6.74 ± 0.19	495.71 ± 56.64
G-CSF	70.39 ± 1.54	29.61 ± 1.54	17.59 ± 1.59	6.68 ± 0.10	505.43 ± 35.34

表 2 显示了给予 sOGP 5 天后, 再联合 rh G-CSF 对正常小鼠给药, 对正常小鼠股骨的骨髓有核细胞总数及其分类变化的影响。

表 2

	骨髓(细胞数/股骨)(%)			
	对照	sOGP	sOGP+rhG-CSF	rhG-CSF
红系				
红系母细胞	1.57±0.37	1.13±0.30	1.38±0.38	1.63±0.32
早幼红细胞	4.57±0.48	3.37±0.38	3.25±0.49	2.50±0.33
中幼红细胞	12.14±0.86	13.75±1.56	11.38±0.71	12.13±1.92
晚幼红细胞	22.14±1.52	19.63±2.23	19.63±1.82	16.00±2.11
粒系				
粒系母细胞	0.86±0.27	0.75±0.25	0.63±0.18	0.63±0.36
早幼粒细胞	2.29±0.36	1.50±0.27	1.75±0.37	1.88±0.44
中、晚幼粒细胞	11.43±0.90	13.75±1.37	14.25±1.54	11.00±1.00
成熟粒细胞	21.43±1.76	24.25±1.61	24.75±2.38	30.83±2.77
噬酸、噬碱性粒细胞	1.71±0.29	1.63±0.92	1.50±0.32	1.63±0.42
巨核细胞	1.29±0.18	1.00±0.27	0.75±0.25	1.13±0.23
淋巴系				
淋巴细胞、浆细胞	20.57±1.51	19.25±1.65	20.75±1.42	19.38±2.00
有核细胞数/股骨($\times 10^7$)	1.98±0.07	1.82±0.11	1.99±0.11	1.90±0.13

表 3 显示了给予 sOGP 5 天后, 再联合 rh G-CSF 对正常小鼠给药, 对正常小鼠脾脏重量的影响。

5

表 3

	对照	sOGP	sOGP+rhG-CSF	rhG-CSF
脾重(g)	0.136±0.004	0.114±0.005	0.262±0.011	0.252±0.007

表 4 显示了同时给予 sOGP 和 rh G-CSF, 对正常小鼠股骨的骨髓有核细胞总数的影响。

表 4

	对照	sOGP	sOGP+rhG-CSF	rhG-CSF
有核细胞数/股骨($\times 10^7$)	1.74 \pm 0.08	1.74 \pm 0.06	1.88 \pm 0.08	1.75 \pm 0.12

表 5 显示了同时给予 sOGP 和 rh G-CSF, 对正常小鼠脾脏重量的影响。#: 联合给药组与单独使用 rh G-CSF 组比较, $p < 0.05$ 。

5

表 5

	对照	sOGP	sOGP+rhG-CSF	rhG-CSF
脾重(g)	0.112 \pm 0.004	0.102 \pm 0.005	0.300 \pm 0.021	0.244 \pm 0.017

2.5 讨论

1. 先给予 sOGP 5 天后再同时给予 rh G-CSF 对外周血白细胞数的影响; 对白细胞分类的影响, 即粒细胞、淋巴细胞数及其比例的影响, 对红细胞数、血小板数的影响; 对骨髓有核细胞数及骨髓细胞分类的影响; 对胸骨切片的观察; 对小鼠脾脏切片的观察; 对小鼠脾脏重量的影响。

(1)从图 1 可见, 在给药 11 天后, 联合使用 sOGP、rh G-CSF 组, 外周血白细胞(WBC)数显著高于其它组, 约是 rh G-CSF 组的 2.5 倍($p < 0.0005$), 正常对照组的 5 倍($p < 0.00005$)。给药 13 天后, 联合使用 sOGP、rh G-CSF 组, 外周血白细胞数显著高于其它组, 约是 rh G-CSF 组的 2 倍($p < 0.05$), 正常对照组的 4 倍($p < 0.001$)。图 2 显示, 联合使用 sOGP、rh G-CSF 组, 在给药 11 天及 13 天, 可使外周血淋巴细胞(LY)数显著高于其它组, 约是 rh G-CSF 组的 2 倍($p < 0.05$), 约是对照组的 2 倍($p < 0.05-0.0005$)。从表 1 可见, 对白细胞分类的影响, 联合使用 sOGP、rh G-CSF 组, 其中粒细胞在白细胞中所占比例高于对照组以及 sOGP 组, 而低于 rh G-CSF 组; 其中淋巴细胞在白细胞中所占比例低于对照组以及 sOGP 组, 而高于 rh G-CSF 组。而关于对红细胞数、血小板数的影响, 各组间无显著性差异。

(2)从图 3 可见, 阴性对照组(A 图)骨髓细胞正常增生, 三系细胞配比正常, 未见特殊病变; 单独给予 sOGP 组(B 图)骨髓细胞正常增生, 三系细胞配比正常, 未见特殊病变; sOGP 联合 rh G-CSF 组(C 图)骨髓细胞正常增生, 三系细胞配比正常, 未见特殊病变; 单独使用 rh G-CSF 组(D 图)骨髓细胞正常

增生，三系细胞配比正常，成熟粒系在粒系中比例略高(反应性增生，非病理变化)。

(3)从图 4 可见，阴性对照组(A 图)骨髓正常，红髓内有少量造血细胞，粒、红细胞比例约为 0.5: 1，粒系多为不成熟细胞，成熟粒细胞约占粒细胞的 25%左右，巨系轻度增生；单独给予 sOGP 组(B 图)骨髓正常，红髓内少量造血细胞，粒、红比例约为 1: 1，粒系内成熟粒细胞约占粒细胞的 30%左右；sOGP 联合 rh G-CSF 组(C 图)骨髓轻到中度萎缩，红髓中度增生，内有多量造血细胞粒、红比例约为 1.75: 1，巨系中度增生，粒系内成熟粒细胞约占粒细胞的 60%左右；单独使用 rh G-CSF 组(D 图)骨髓轻到中度萎缩，红髓中度增生，内有多量造血细胞粒、红比例约为 2: 1，巨系中度增生，粒系内成熟粒细胞约占粒细胞的 60%左右。本实验结果认为，脾内髓外造血(粒系、红系、巨系)，第三、四组明显，第二组不太明显。根据其病理形态及各系统各阶段细胞配比认为骨髓造血功能的反应性增生而非属肿瘤性增生。

(4)由表 2 可见，联合使用 sOGP、rh G-CSF 组小鼠的股骨骨髓有核细胞数与其它三组无显著性差异，并未造成骨髓异常增生。与对照组相比，联合用药组的早幼粒细胞数少，中、晚幼粒细胞数以及成熟粒细胞数增高，说明可以加快早幼粒细胞成熟，并可能加快较成熟的粒细胞从骨髓释放到外周血，从而促进外周血白细胞数。

(5)由表 3 可见，联合使用 sOGP、rh G-CSF 组小鼠，单独使用 rh G-CSF 组小鼠的脾脏重量显著性地高于其它两组，联合使用 sOGP、rh G-CSF 组小鼠脾脏重量有高于单独使用 rh G-CSF 组的趋势，但没有显著性差异，说明可能通过促进脾脏造血，从而增加外周血白细胞数。

2. 同时给予 sOGP、rh G-CSF，检测其对小鼠外周血白细胞数的影响；对小鼠外周血淋巴细胞数的影响；对小鼠脾脏重量的影响。

(1)由图 5 可见，同时给予 sOGP、rh G-CSF 组 10 天后，外周血白细胞数显著性高于其它组，约是 rh G-CSF 组的 2.3 倍($p < 0.0005$)，正常对照组的 5.3 倍($p < 0.00005$)。

(2)由表 4 可见，联合使用 sOGP、rh G-CSF 组小鼠的股骨骨髓有核细胞数与其它三组无显著性差异，并未造成骨髓异常增生。

(3)由表 5 可见，同时给予 sOGP、rh G-CSF 组，单独使用 rh G-CSF 组小

鼠的脾脏重量显著性地高于其它两组，联合使用 sOGP、 rh G-CSF 组小鼠脾脏重量显著性高于单独使用 rh G-CSF 组 ($p<0.05$)。

实施例 3

5 成骨生长肽和 G-CSF 在促进造血方面的协同作用

在本实施例中，研究在成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的不同摩尔比情况下的协同作用。

基本上按实施例 2 中实验方法 2 的方法，不同点仅在于改变 OGP 的用量，使成骨生长肽与粒细胞集落刺激因子的摩尔比为 0.5:1, 1:1, 10: 1, 20: 1。

10 结果，仍然观察到了成骨生长肽和 G-CSF 在促进造血方面的协同作用。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于

15 本申请所附权利要求书所限定的范围。

说明书附图

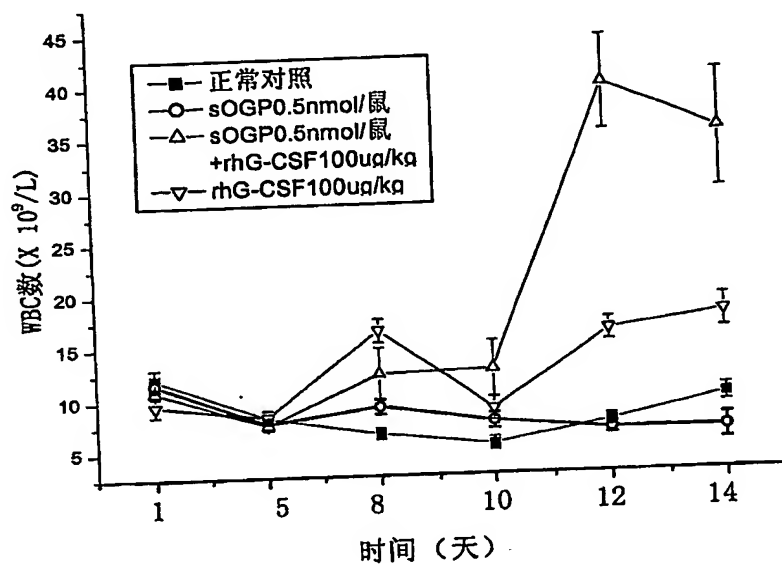


图 1

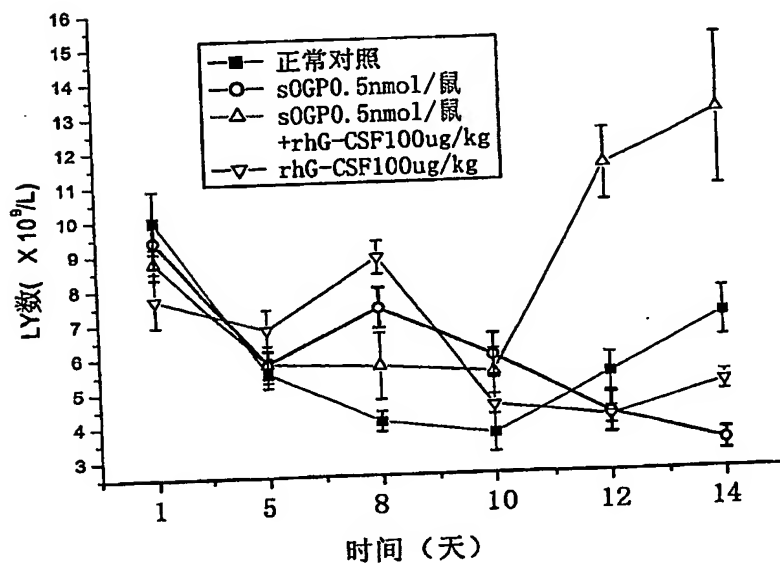


图 2

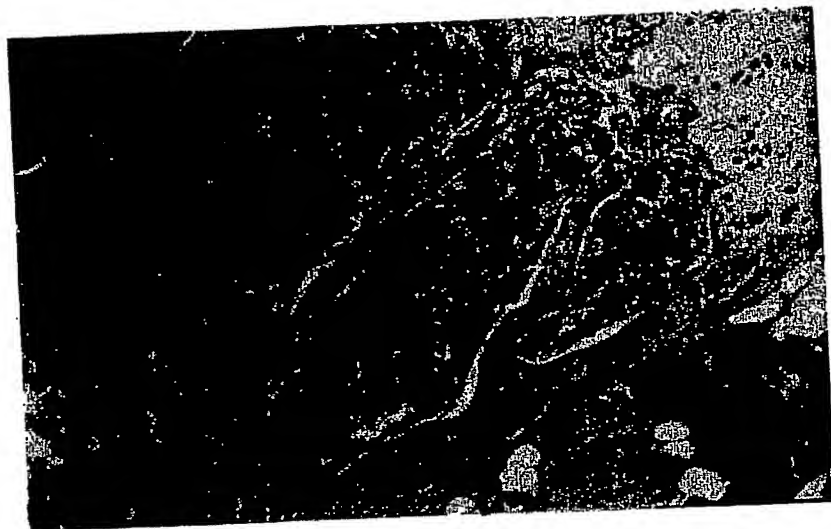


图 3A



图 3B

BEST AVAILABLE COPY

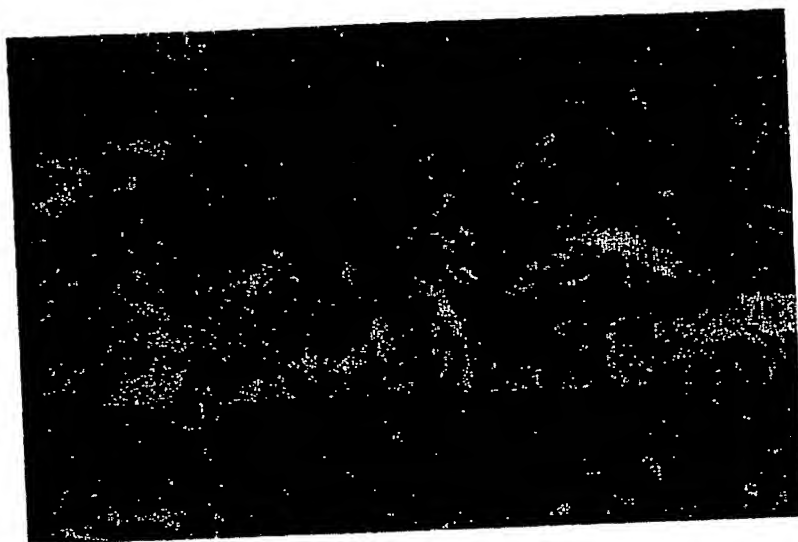


图 3C

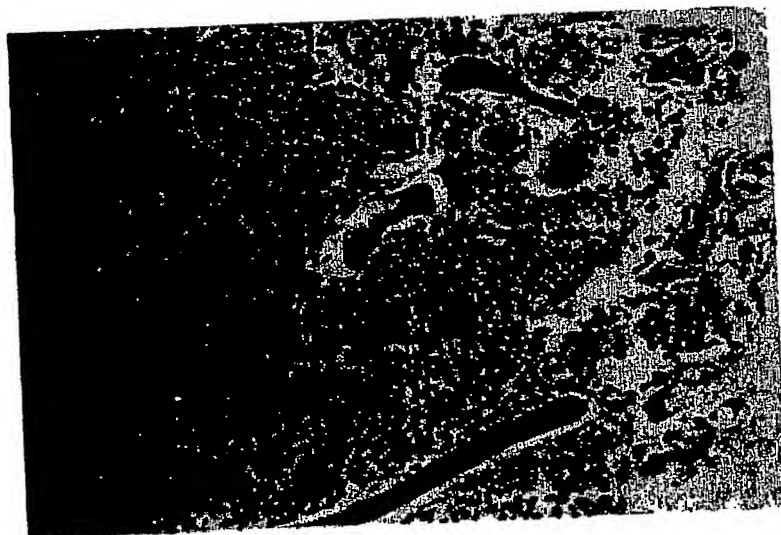


图 3D

BEST AVAILABLE COPY

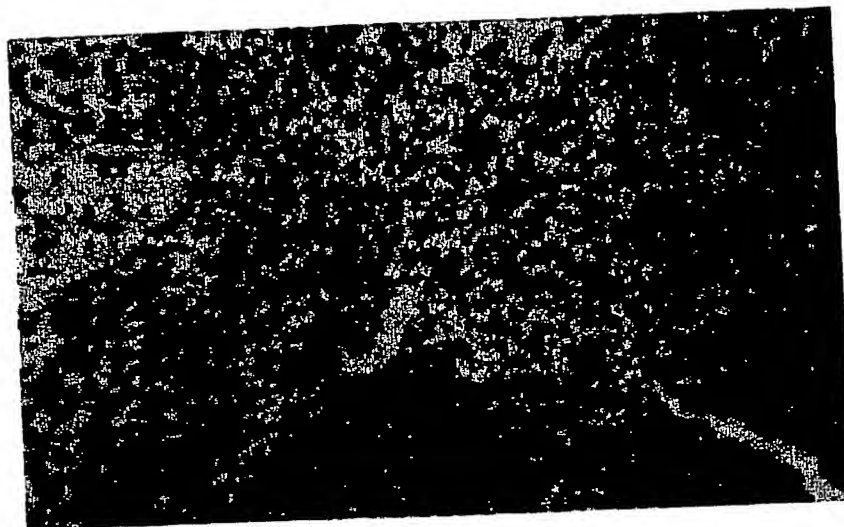


图 4A

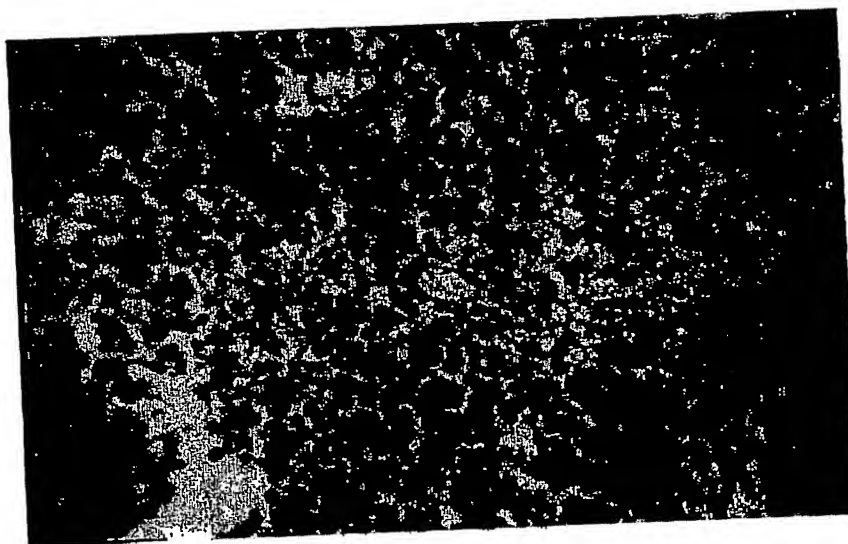


图 4B

BEST AVAILABLE COPY

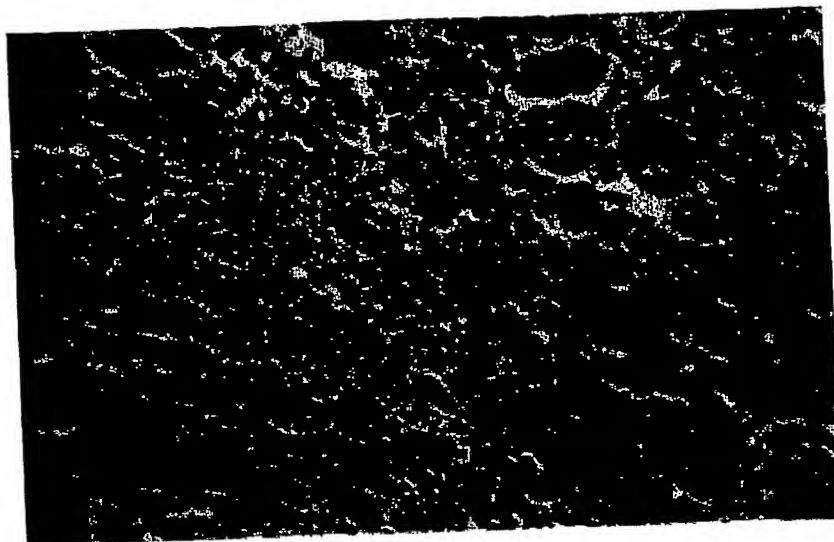


图 4C



图 4D

BEST AVAILABLE COPY

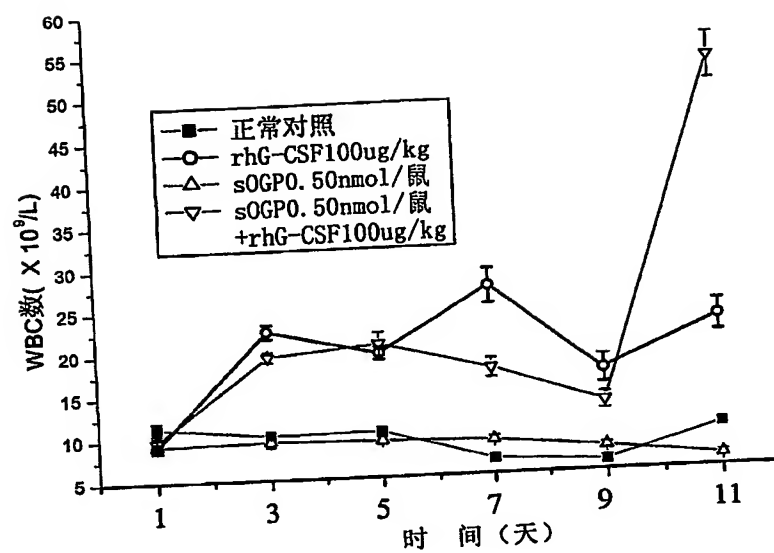


图 5